



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1056008 A

3(5D) G 01 N 21/54; A 61 B 10/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

- (21) 3388006/18-25
(22) 25.01.82
(46) 23.11.83. Вюл. № 43
(72) А.Н.Третьяков, И.Я.Барский,
В.В.Зенин, Г.В.Папаян, Ю.М.Розанов
и С.И.Степанов
(53) 535.37 (088.8)
(56) 1. Gohde W. Automation of cy-
togluorometry by use of the impuls-
microphotometer. - "Fluorescence
techniques in cell biology" Spring-
er verlag. Berlin - techniques
in cell biology.
2. Gray J.W. et al. Slit Scan
flow cytometry of mammalian chro-
mosomes. J. Histochem and Cytochem,
1979, V. 27, № 1, pp. 441-444.
3. Lindmo T and Steen H.B. Charac-
teristics of a simple high - reso-
lution flow cytometer based on a
new flow configuration. Biophys J.
1979, V 28, № 1; pp. 33-34 (про-
тотип).

(54) (57) ПРОТОЧНЫЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТР,
содержащий флуоресцентный микро-
скоп, форсунку для подачи и гидро-
динамической фокусировки жидкости
с исследуемыми клетками, покровное
стекло микроскопа, систему для от-
вода жидкости с клетками, о т л и -
ч а ю щ и я с я тем, что, с целью
повышения точности и производите-
льности измерений, форсунка разме-
щена под покровным стеклом, а систе-
ма отвода жидкости с клетками вы-
полнена в виде полости смачиваю-
щегося материала, прикрепленной к
нижней поверхности покровного стек-
ла под объективом микроскопа, при-
чем для обеспечения стационарного
потока жидкости с клетками расстоя-
ние от края пятна жидкости на покров-
ном стекле до места прикрепления
полости составляет величину 0,5 -
1,0 от ширины пятна.

08 SU (11) 1056008 A

Изобретение относится к технической физике, а именно к аналитической микроскопии, в частности к приборам для биологии и медицины, и наиболее эффективно может быть использовано для скоростного автоматического анализа содержания клеточных компонентов и изучения их физико-химического состояния путем измерения флуоресцентных характеристик большого числа отдельных клеток.

Известен проточный цитофлуориметр на базе флуоресцентного микроскопа, предназначенный для автоматической регистрации флуоресцентных параметров отдельных клеток в составе клеточной суспензии со скоростью измерения до нескольких тысяч клеток в секунду. В этом приборе взвесь исследуемых клеток поступает из капилляра в проточную камеру, расположенную на предметном столике микроскопа и проходит с током жидкости в горизонтальном направлении с большой скоростью через поле зрения микрообъектива. В момент прохождения клетки перед микрообъективом, сфокусированном на определенную плоскость, осуществляется освещение клетки возбуждающими лучами от источника света; на выходе датчика излучения фотометрической насадки формируется импульс, амплитуда которого пропорциональна интенсивности флуоресценции. Система регистрации проводит анализ амплитудного распределения импульсов и выдает гистограмму распределения клеток по интенсивности их свечения. Стабилизация положения горизонтального потока клеток при их прохождении в поле зрения объектива осуществляется с помощью гидродинамической фокусировки: в камере под давлением создается горизонтальный ток жидкости, в центре которого располагается капилляр с исследуемыми клетками [1] и [2].

Недостатком указанного прибора является малая стабильность положения клеток относительно объектива, в результате чего клетки выходят за пределы глубины резкости микрообъектива, что приводит к уменьшению точности измерения. Другим недостатком прибора является невозможность использования в нем высокоапертурных иммерсионных объективов, имеющих обычно малое рабочее состояние, не позволяющее сфокусироваться на измеряемые клетки через стенку камеры и слой жидкости, находящийся перед клетками.

Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому является проточный цитофлуориметр, со-

державший флуоресцентный микроскоп, форсунку для подачи и гидродинамической фокусировки жидкости с исследуемыми клетками, покровное стекло микроскопа, систему для отвода жидкости с клетками. В этом устройстве стабильный горизонтальный поток клеток в плоскости фокусировки инвертированного микроскопа обеспечивается гидродинамической фокусировкой клеток в струе жидкости, падающей под углом на верхнюю поверхность покровного стекла и собираемой с него с помощью отсасывающего насоса [3].

Недостатком этой конструкции прибора является невозможность использования в нем обычных (неинвертированных) флуоресцентных микроскопов, которые в частности комплектуются светосильными высокоапертурными иммерсионными микрообъективами, необходимыми для точных флуориметрических измерений. Другим недостатком известной конструкции является необходимость использования в ней принудительного (с помощью насоса) отвода жидкости с клетками со дна камеры, что усложняет конструкцию камеры и понижает надежность и точность измерения и удобства ее эксплуатации.

Целью изобретения является повышение точности и производительности измерений.

Для достижения цели в проточном цитофлуориметре, содержащем флуоресцентный микроскоп, форсунку для подачи и гидродинамической фокусировки жидкости с исследуемыми клетками, покровное стекло микроскопа, систему для отвода жидкости с клетками, форсунка размещена под покровным стеклом, а система отвода жидкости с клетками выполнена в виде полости смачивающего материала, прикрепленной к нижней поверхности покровного стекла под объективом микроскопа, причем для обеспечения стационарного потока жидкости с клетками расстояние от края пятна жидкости на покровном стекле до места прикрепления полости составляет величину 0,5-1,0 от ширины пятна.

На чертеже показана принципиальная схема проточного цитофлуориметра.

Проточная камера состоит из корпуса 1 и размещенной в ней форсунки 2. Вдоль оси форсунки расположен капилляр 3, по которому подается суспензия клеток. Корпус форсунки имеет патрубок 4 для подачи воды в форсунку. На корпусе камеры закрепляется покровное стекло 5. Полоска смачивающегося материала 6 закрепляется в верхней части корпуса камеры и касается нижней поверхности

покровного стекла. В нижней части корпуса камеры имеется патрубок 7 для стока воды. Проточная камера крепится на предметном столике 8 флуоресцентного микроскопа. Функциональная схема проточного цитофлуориметра включает микрообъектив 9, источник 10 света, коллектор 11, полевую диафрагму 12, светофильтры 13 для выделения возбуждающего света, светофильтр 14 для выделения света флуоресценции, интерференционную светоделительную пластинку 15, фотоэлектронный умножитель 16, спектрометрический усилитель 17, многоканальный анализатор 18 импульсов.

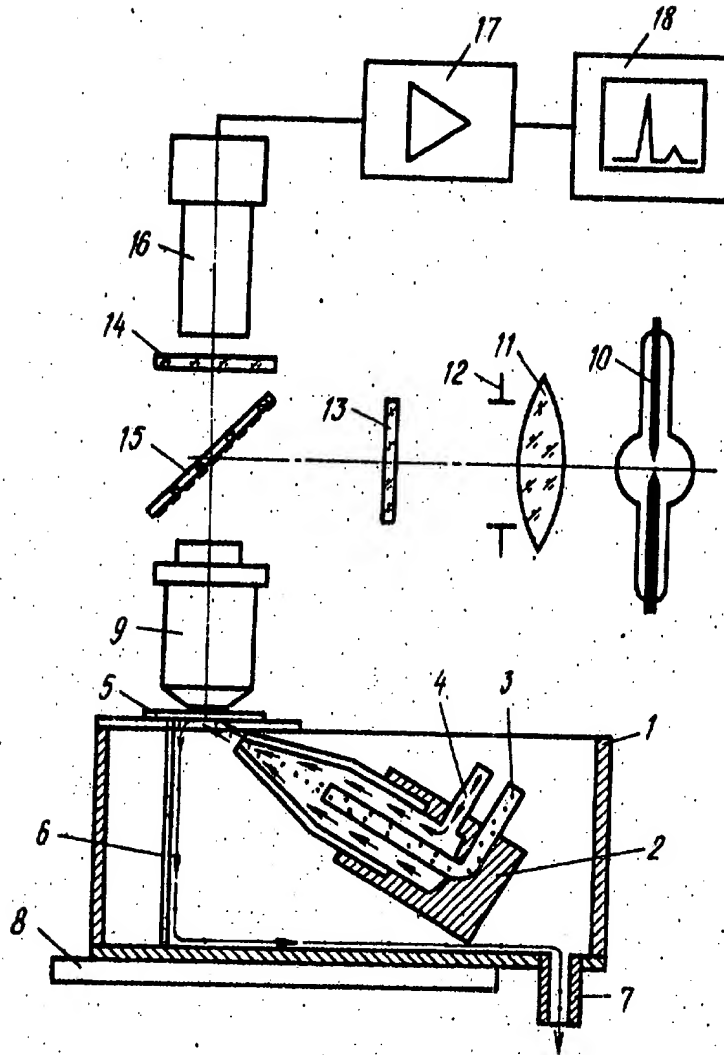
Проточный цитофлуориметр работает следующим образом.

Суспензия клеток, предварительно меченых флуоресцирующим красителем, подается с постоянной скоростью в центральный капилляр 3 форсунки 2. Одновременно через патрубок 4 в форсунку под давлением 0,6-0,8 атм поступает вода, которая обтекает центральный капилляр 3, при этом за счет гидродинамической фокусировки клетки в суспензии выстраиваются вдоль оси форсунки. Таким образом, формируется ламинарная коаксиальная струя диаметром 150 мкм, вдоль оси которой выстраиваются клетки суспензии. Эта струя, несущая клетки, направляется снизу вверх под углом 60-70° на нижнюю поверхность покровного стекла 5.

В месте падения на покровное стекло струя расплощивается и образует пятно эллипсовидной формы, длина и ширина которого зависят от внутреннего диаметра форсунки, угла падения струи на покровное стекло и давления подачи жидкости. На определенном расстоянии от края пятна по току жидкости (0,5-1,10 от ширины пятна) прикрепляется полоса смачивающегося материала 6, с помощью которой жидкость с клетками самотоком стекает с покровного стекла на дно камеры и затем через патрубок 7 удаляется из нее. Расстояние, на котором прикрепляется полоска 6, достаточно для того, чтобы было исключено возникновение значительной турбулентности при ударе жидкости о полосу, и в то же время это расстояние не слишком велико, иначе на нижней поверхности покровного стекла до полоски будет

равномерный ток жидкости. Для обеспечения стационарного потока жидкости расстояние от края пятна жидкости на покровном стекле до места прикрепления полоски должно составлять величину 0,5-1,0 от ширины пятна, что при диаметре выходного отверстия форсунки 150 мкм, угле падения жидкости на покровное стекло 60-70° и давлении подачи жидкости 0,6-0,8 атм соответствует 1-2 мм и общему расстоянию от места падения струи до места прикрепления полоски смачивающего материала 3-4 мм. При этом в поле зрения микрообъектива 9 формируется стабильный поток клеток. Во время нахождения клетки в поле зрения объектива возбуждается флуоресценция красителя, связанного с определенным внутриклеточным веществом (например, ДНК, белком). Источником возбуждающего флуоресценцию света является ртутная лампа 10. Свет от нее собирается коллектором 11 и при помощи интерференционной светоделительной пластинки 15 направляется через микрообъектив 9 на исследуемые клетки. Светофильтры 13 и 14 выделяют полосы возбуждения и флуоресценции соответственно. Фотоэлектронный умножитель 16 преобразует световые сигналы свечения клеток, пересекающих поле зрения микроскопа, в электрические, которые затем усиливаются с помощью спектрометрического усилителя 17 и поступают на вход многоканального амплитудного анализатора 18. В результате амплитудного анализа получается гистограмма распределения измеряемого в клетках вещества.

Таким образом, предлагаемое устройство может быть установлено на предметном столике любого серийного флуоресцентного микроскопа, превращая его при соответствующей комплектации промышленности электронными блоками в прибор для скоростного автоматического анализа свойств клеток. Кроме того, это устройство проще известного по конструкции и в изготовлении, так как насос, применяемый в известном устройстве для отвода жидкости с клетками, заменен полоской смачивающегося материала, благодаря чему сбор скопившейся на покровном стекле жидкости с клетками осуществляется самотоком.



Редактор Н.Лазаренко Составитель Н.Зоров Техред Л.Пилипенко Корректор А.Тяско
 Заказ 9289/33 Тираж 873 Подписное
 ВНИИПИ Государственного комитета СССР
 по делам изобретений и открытий
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5
 Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4